



Ролята на миелоидните клетки в промоцията на процеса на неоангиогенеза при карциномите на глава и шия

The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis in head and neck carcinomas

И. Чалъков, Т. М. Попов

*Катедра по ушни, носни и гърлени болести и хирургия на глава и шия,
Медицински университет – София*

Резюме

Различни епидемиологични, клинични и експериментални студии не само демонстрират връзка между хроничното възпаление и иницирането на неопластичния процес, но и показват, че медиаторите на възпалението имат значимо място в допринасянето за туморната прогресия. Доказано е, че ангиогенезата има решаваща роля в създаването на кръвоносна мрежа, позволяваща на тумора да расте и метастазира. Въпреки че се смята, че туморните клетки са основният двигател за туморна неоангиогенеза, все повече доказателства се появяват в полза на теорията, че тумор-инфилтриращите миелоидни клетки като моноцити/макрофаги, неутрофили, еозинофили, мастоцити и дендритни клетки заемат централна роля в този процес. Това ревю се фокусира върху многостранните способности на всяка една от тези клетки да промотира туморна ангиогенеза и начина, по който тези про-туморни функции се активират и модулират от туморната микро среда. Възможната роля в туморната ангиогенеза на други клетки, произлизащи от костния мозък, като тромбоцити, прогениторни ендотелни клетки и хемопоектични стволови клетки, също трябва да бъде дискутирана.

Ключови думи: ангиогенеза, VEGF-A, HIF, Notch

Abstract

Various epidemiological, clinical and experimental studies have not only demonstrated a link between chronic inflammation and cancer onset but also shown that inflammatory mediators such as myeloid cells significantly contribute to tumour progression. Tumour angiogenesis is a crucial step in tumour development as tumours have to establish a blood supply in order to grow and metastasize. Although tumour cells were first thought to drive the cellular events underpinning tumour angiogenesis, considerable evidence has now emerged for the central role of tumour-infiltrating myeloid cells such as monocyte/macrophages, neutrophils, eosinophils, mast cells (MC) and dendritic cells (DC) in this phenomenon. This Review focuses on the multifaceted ability of each of these cell types to promote tumour angiogenesis and the way in which these pro-tumour functions are activated and modulated by the tumour microenvironment.

Макрофаги

Тези високомногостранни, мултифункционални клетки се характеризират от тяхната способност да поглъщат инвазиращи микроби или клетъчен дебрис от места с нарушена цялост, да секретират голям спектър от имуномодулаторни цитокини, да представят антигени на Т-клетките, както и да играят ролята на допълващи активацията на лимфоцитите клетки. Проявяват високи нива на пластичност, променящи техния фенотип, така че да отговаря на микро средата, в която те се намират. Конвенционално макрофагите се разделят на M1 (класически активирани) и M2 (алтернативно активирани) фенотипи. M1 макрофагите показват провъзпалителен фенотип и се активират от липополизахариди и интерферон-гама, като секретират бактерицидни фактори и промотират Т-хелпер-1 (Th1) имунен отговор. В контраст M2 макрофагите имат имуносупресивен фенотип и освобождават цитокини, промотиращи Th2 имунен отговор. Макрофагите в тумора обикновено се наричат тумор-асоциирани макрофаги (TAMs) и най-често експресират M2 фенотип. Въпреки това има доказателства, че фенотипът варира според стадия на тумора – M1 подобни клетки най-често преобладават на места с хронично възпаление, където има вероятност да се развие тумор, и впоследствие превключват на M2 фенотип, когато туморът започне да инвазира, васкуларизира и развива. Обикновено има висок брой TAMs в малигнени тумори, отколкото в нормалната заобикаляща тъкан. Тези клетки в началото екстравазират около туморните съдове под формата на дошли от кръвта моноцити и бързи диференциращи се до TAMs. Набирането на моноцити от кръвта се получава чрез хемоатраканти,

секретирани както от малигнените, така и от стромалните клетки на тумора. Основният хемокин е CCL2 (MCP-1), чиято експресия е обикновено увеличена в туморната тъкан. Увеличени нива на други атрактанти хемокини, привличащи моноцитите, са описани – такива са: плацентарният растежен фактор (PGF), CCL3 (MIP-1alpha), CCL4 (MIP-1beta), CCL5. Допълнително мощният про-ангиогенен фактор – съдов ендотелен растежен фактор (VEGF), също притежава хемотаксични качества към моноцити. S100A8 и S100A9 също са доказани като привличащи моноцити от кръвното русло при аденокарцином на белия дроб.

TAM имат дълбоко влияние върху регулацията на туморната ангиогенеза. Няколко клинични изследвания показват корелация между високия брой TAM в туморната тъкан и увеличена микросъдова плътност (4-8), което показва високата вероятност тези клетки да промотират туморната ангиогенеза. Студии показват увеличено, че броят TAM се увеличават в премалигнени лезии точно преди ангиогенното превключване (angiogenic switch), което предшества преминаването в малигнено състояние. Намалението на макрофагите при този модел води до 50% редукция на съдовата плътност, което съответно довежда до забавена туморна прогресия и метастазиране. Съответно реинтродукцията им в модела води до значително увеличение на съдовата плътност и ускорение на туморния растеж (9). Допълнително доказателство за важността на TAM са изследванията, доказващи, че при премахнати от циркулацията моноцити (чрез липозоми клондронат) се намаляват TAM и съответно плътността на ангиогенеза при ксенографти карцином на белия дроб. TAM експресират множество про-ангиогенни и ангиогенеза-модулиращи фактори, като VEGF, basic Fibroblast growth factor, TNFalpha, IL-1beta, IL-8, COX2, плазминогенен активатор, урокиназа, platelet derived growth factor, matrix metalloproteinase 7, 9 и 12. Вече е известно, че самата микросреда на тумора стимулира про-ангиогенните функции на макрофагите – например чрез TNF alpha секретирани от овариални туморни клетки. Туморната хипоксия също има основна роля – TAM се локализируют и акумулират на хипоксични и некротични части от тумора (8). Хипоксията се развива на места от туморите, в които има неадекватна перфузия поради развитието и дизорганизацията на незрели кръвоносни съдове (10). Смята се, че тези места привличат TAM чрез освобождаването на хипоксия-индуцирани хемоатрактанти като VEGF, ендотелин и EMAPII (SCYE1) (11). Също може да включ-

ва и освобождаването на high mobility group 1 (HMGB1) от некротични клетки в области на хронична туморна хипоксия и/или исхемия.

При хипоксия макрофагите отговарят, като свръхрегулират хипоксия-индуцируемите транскрипционни фактори, което води до транскрипция на редица гени, стимулиращи клетъчната пролиферация, метаболизъм и ангиогенезата (12). Скоро се откри, че и транскрипционните фактори ATF4, и EGR1 също са свръхрегулирани при хипоксични макрофаги, въпреки че тяхната роля в регулацията на хипоксия-индуцируемите гени е все още неизвестна.

TAM експресират VEGF почти изцяло само в хипоксични и перинекротични зони (13). Също така фактът, че TAM увеличават нивата на MMP7 в хипоксични зони на тумора, може да има връзка не само с туморната ангиогенеза, но и значение за метастазирането. Скорошни данни показват, че TAM (може би заедно с други клетки на възпалението като Т-клетките) могат да експресират високи нива на RANKL (TNFSF11), който директно може да стимулира туморните клетки за експресират по-метастатичен фенотип (14). MMP7 разцепва активната форма на RANKL от клетъчната повърхност, така че увеличената експресия на MMP7 може да увеличава освобождаването на RANKL от макрофагите и Т-клетки и да тласка туморната прогресия. При хипоксични условия макрофагите експресират повишено и nuclear factor kappaB (NFkB), което при високи нива е доказано, че изкривява пътя на диференциация на TAM към M2 фенотип. Няколко изследвания доказват допълнително и че при достатъчна стимулация от страна на ангиогенни растежни фактори TAM могат да се диференцират до ендотелни клетки.

TIE2-експресирани моноцити (TEM)

Тази скоро открита субпопулация от циркулиращи в кръвта моноцити се различава от експресията си на ангиопоетин рецептора TIE2. TEM се откриват както в кръвта, така и в туморната тъкан. Открито е, че те са „обречени“ да се диференцират до TAM. TIE2 моноцитите биват привлечени от свръхрегулираните в туморните клетки хемокини CCL3, CCL5, CCL8, които се свързват с рецепторите по мембраната на TEM CCR1 и CCR5. Допълнително тази субпопулация моноцити привлечена и от ангиопоетин 2 (ANGPT2), цитокин експресиран както от хипоксични туморни клетки, така и ендотелни клетки част от туморната неоваскуларна мрежа. ANGPT2 допълнително освен хемотаксична функция потиска и освобож-



даването от ТЕМ на IL-12, цитокин потискащ ангиогенезата. IL-12 се потиска и от хипоксична среда, а последната допълнително стимулира експресията на TIE2 при ТЕМ (15). ТЕМ пребивават основно в периваскуларни и хипоксични аваскуларни зони на тумора, като се смята, че те са привлечени в тях от ангиопетин 2. Близостта на ТЕМ с туморната васкуларна мрежа е повод на Де Палма да смята, че тези клетки подпомагат регулацията на туморната ангиогенеза. Те доказват тези свои твърдения чрез серия от експерименти, визуализиращи зависимостта на неоангиогенезата от тези клетки. Интересно е, че аблацията на ТЕМ субпопулацията не е нарушила по никакъв начин привличането и пребиваването на ТАМ или неутрофили в туморната тъкан, т.е. те не представляват прекурсори на ТАМ, а отделна субпопулация моноцити със собствена проангиогенна роля, въпреки по-малката си популация в туморната микросреда. Допълнително е открито, че те имат много по-мощно проангиогенно действие (въпреки по-малката си бройка) от ТАМ, т.е. TIE2 експресията е маркер за много високо ниво на проангиогенност. TIE2 моноцитите не се откриват в нормална тъкан, което индицира, че туморната тъкан селективно привлича тази субпопулация. Механизмите, чрез които се стимулира неоангиогенезата от тези клетки, се изясняват, но се смята, че паракринно, поради близкия си стоеж периваскуларно, ТЕМ секретират в тяхна непосредствена близост множество растежни фактори, както и че стимулират освобождаването на последните от екстрацелуларния матрикс чрез секреция на протеолитични фактори като MMP9.

Хемангиоцити

Този термин е въведен от Рафи и колеги, за да опишат хетерогенна смесица от незрели и диференцирани миелоидни клетки, които експресират и VEGFR1, и CXCR4 (при мишки) и имат мощни проангиогенни свойства *in vivo*. Тези клетки експресират и TIE2 и различни прогениторни маркери като SCA1 (LY6A) и CD117 (KIT). Доскоро те бяха намирани само в немалигнени тъкани, където тяхна функция е да възстановяват перфузията и да противодействат на исхемията. Все още не е напълно потвърдено съществуването им в туморна тъкан. Едно изследване открива наличие на CD45, VEGFR1, TIE2 и CD11b (HIF dependent manner чрез свръхекспресия на CXCL12). Тази субпопулация клетки секретират високи дози MMP9, което увеличава от своя страна бионаличността на VEGF (16). Тъй като рецепторът на CXCL12 е CXCR4, е

възможно тези клетки да са експресирали CXCR4 и да са в действителност хемангиоцити.

Миелоид-произхождащи супресорни клетки (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC)

Представяват отново хетерогенна популация от клетки, съставена от незрели миелоидни прогениторни на неутрофилите, моноцитите и дендритните клетки. Те могат да бъдат разделени на две субфракции – CD11b+Gr1^{hi}, които имат фенотип на незрял неутрофил, и CD11b+Gr1^{low}, които наподобяват моноцити. За разлика от зрелите неутрофили, MDSC има мощна имunosupресивна функция и експресират ниски нива на MHC клас 2 и CD80 (ко-стимулаторен сигнал, необходим на Т-клетките за тяхната активация и преживяване). Именно тяхната способност да потискат анти-туморната функция на Т-клетките и NK-клетките ни дава възможност да ги идентифицираме (17). Изследванията показват, че те експресират по тяхната повърхност CD11b и CD33, но много ниски нива или никакви на CD14 или Lin. Наличието на MDSC в периферната кръв и туморна тъкан е било описано при пациенти с различни форми на рак и корелират с клиничния стадий. Тази увеличена продукция в костния мозък на болни с неоплазия се медира отчасти от цитокините BV8 (PROK2) и ендокринен VEGF (Endocrine gland derived- VEGF). BV8 е важен за мобилизирането от костния мозък на MDSC и привличането им към туморната тъкан от кръвното русло, увеличава броя им в циркулацията. Допълнително хемотаксично действие имат и CCL2, CXCL12, CXCL5 и стволово клетъчен фактор (SCF, KIT ligand), които се свързват със съответните им рецептори – CCR2, CXCR4, CXCR2 (IL8RB) и CD117 експресирани върху MDSC. Един път привлечени към тумора, MDSC имат значим ефект върху туморната прогресия. Основната им роля е да имunosupресират антитуморния отговор на имунната система – потискат Т- и NK-клетките чрез продукцията на iNOS и arginase-1. Допълнително е открита връзка с процеса на неоангиогенеза – клетките я стимулират мощно. MDSC експресират високи нива на MMPs (MMP2, MMP9, MMP13, MMP14) и увеличават бионаличността на VEGF в туморната микросреда. Sinha et al демонстрират, че клетъчният контакт между MDSC и ТАМ води до увеличена продукция на IL10 от страна на MDSC и намалена продукция на IL12 от ТАМs, което има общ стимулиращ ефект върху промоцията на тумор-промотиращ тип 2 отговор, спомагащ туморната прогресия. Повишена експресия на BV8 и CXCL12 се увели-

чава и при хипоксия, затова е възможно MDSC да бъдат привличани именно на хипоксични места в туморната тъкан, за да стимулират на тези места неопластичната. Както и TEM, така и MDSC са наблюдавани също и в близост до туморни кръвоносни съдове (периваскуларно). За разлика от TEM обаче, MDSC понякога променят формата си и заприличват на ендотелни клетки и експресират CD31 (PECAM1) и VEGFR2, което показва как тези клетки имат възможността да се диференцират до ендотелни клетки на новообразуваните съдови структури на тумора. В заключение данните показват, че MDSC стимулират ангиогенезата чрез секрецията на MMP9 и диференцирайки се до ендотелно-подобни клетки.

Ясно е, че TEM и MDSC имат ключова роля в регулирането на туморната ангиогенеза, но все още не е ясно дали тези две групи са отделни миелоидни популации, или са взаимно застъпващи се (overlapping) проангиогенни миелоидни клетки с капацитет за подчертана пластичност. Макар и противоречащо за момента, има доказателства за възможността MDSC клетки да се диференцират *in vitro* в зрели макрофаги (F4/80+), дендритни клетки (CD11c⁺, MHC клас II⁺) или гранулоцити в зависимост от локалните стимули. Необходим е задълбочен анализ на фенотипа и функцията на тези клетки.

Неутрофили

Отличаващата ги експресия от останалите левкоцит CD66B. Идентификацията им основно лежи на оцветяването им с цитоплазмения маркер миелопероксидаза (MPO) заедно с клетъчна морфология. Такива клетки са наблюдавани в тумори на колона, стомаха и бронхоалвеоларни карциноми, където корелират с лоша прогноза. Миграцията им се медира основно от CXCL хемокините, които се свързват и активират CXCR1 (IL8RA) и/или CXCR2. CXCL8 (IL8) е свръхекспресиран в редица карциноми и може допълнително да се повиши

от проинфламаторни цитокини, NO, хипоксия, ацидоза и хипергликемия. Блок доказва положителна корелация между нивата на CXCL8 при пациенти с бронхоалвеоларен карцином и броя на тумор-инфилтриращи неутрофили, което показва, че CXCL8, секретирани от тези тумори, привлича неутрофили към туморните огнища. Има данни, че тези клетки промотират неопластичната, като тумор асоциираните неутрофили се смятат за основен източник на MMP9 (заедно с макрофагите и мастоцитите). Последният ензим участва активно в промоцията на ангиогенезата чрез своите разграждащи свойства върху екстрацелуларния матрикс. Активността на MMP9 се регулира от TIMP1, който формира комплекс с MMP9 и инхибира активността му. Интересно е, че неутрофили произвеждат свободни от TIMP1 ензими MMP9, т.е. без инхибитор.

Активирани неутрофили секретират директно и група разтворими проангиогенни фактори. При стимулацията им с TNF alpha неутрофилите се дегранулират, освобождавайки VEGF от интрацелуларните депа, което впоследствие индуцира ендотелна пролиферация и тубулна формация *in vitro*. При карцином на гърдата е открито *in vitro*, че неутрофилите секретират oncostatin M, чрез който стимулират самите туморни клетки да произвеждат VEGF и така да се копрометира ангиогенезата. TNFalpha заедно с гранулоцито-макрофаго-колониален стимулиращ фактор (GM-CSF, CSF2) и platelet-activating factor активират неутрофилите да секретират и CXCL8, и CXCL1. CXCL8 стимулира дегранулацията и освобождаването на MMP9 от неутрофилите, който съответно разцепва аминокислотния терминал на CXCL8, за да се получи протеин, десет пъти по-мощен хемокин. Така се създава положителна обратна връзка за привличане на още повече неутрофили, които допълнително да стимулират ангиогенезата. За разлика от TAMs неутрофилите не отговарят на хипоксията с увеличена секреция на VEGF.

Литература

1. Sierko, E. & Wojtukiewicz, M. Z. Platelets and angiogenesis in malignancy. *Semin. Thromb. Hemost.* 30, 95-108 (2004).
2. Bertolini, F., Shaked, Y., Mancuso, P. & Kerbel, R. S. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nature Rev. Cancer* 6, 835-845 (2006).
3. Purhonen, S. et al. Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 6620-6625 (2008).
4. Leek, R. D. et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 56, 4625-4629 (1996).
5. Onita, T. et al. Hypoxia-induced, perinecrotic expression of endothelial Per-ARNT-Sim domain protein-1/hypoxia-inducible factor-2α correlates with tumor progression, vascularization, and focal macrophage infiltration in bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 471-480 (2002).
6. Takanami, I., Takeuchi, K. & Kodaira, S. Tumor-associated macrophage infiltration in pulmonary adenocarcinoma: association with angiogenesis and poor prognosis. *Oncology* 57, 138-142 (1999).
7. Valkovic, T. et al. Correlation between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and tumor-associated macrophages in invasive ductal breast carcinoma. *Virchows Arch.* 440, 583-588 (2002).
8. Li, C., Shintani, S., Terakado, N., Nakashiro, K. & Hamakawa, H. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 9, 1219-1223 (2002).
9. Lin, E. Y. et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Res.* 66, 11238-11246 (2006). This



- study in transgenic murine mammary tumour model to show that TAM have a key role in promoting tumour angiogenesis, and thus in tumour development and metastasis.
10. Vaupel, P., Kelleher, D. K. & Hockel, M. Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin. Oncol.* 28, 29-35 (2001).
 11. Murdoch, C., Giannoudis, A. & Lewis, C. E. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 104, 2224-2234 (2004).
 12. Lewis, C. E. & Murdoch, C. Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anticancer therapies. *Am. J. Pathol.* 167, 627-635 (2005).
 13. Lewis, J. S., Landers, R. J., Underwood, J. C., Harris, A. L. & Lewis, C. E. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J. Pathol.* 192, 150-158 (2000).
 14. Luo, J. L. et al. Nuclear cytokine-activated IKK α controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature* 446, 690-694 (2007).
 15. Murdoch, C., Tazzyman, S., Webster, S. & Lewis, C. E. Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J. Immunol.* 178, 7405-7411 (2007). This paper is the first to show that angiopoietin 2 (especially in the presence of hypoxia) changes the phenotype of TIE2-expressing monocytes.
 16. Du, R. et al. HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 13, 206-220 (2008).
 17. Gabrilovich, D. I. et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 67, 425 (2007).

